

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291066

研究課題名(和文) 視床下部で発見した分泌タンパク質の生理的意義と作用機序の解明

研究課題名(英文) Study on physiological significance and mechanisms of a novel hypothalamic secretory protein

研究代表者

浮穴 和義 (Ukena, Kazuyoshi)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：10304370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、鳥類ニワトリの視床下部から分泌性小タンパク質をコードする新規遺伝子を見出し、NPGLと命名した。本研究では、合成NPGLの産出方法の確立、ラットとマウスにおける生理的意義と作用機序を解明する研究を行った。ラットにおいて、NPGLは摂食行動や脂肪組織重量の増加を引き起こすことが分かった。絶食や血中インスリンレベルの低下により遺伝子発現が増加した。次に、マウスを用いて、NPGL遺伝子の発現分布や局在解析を行った。マウスでは視床下部の弓状核尾側部に発現し、その神経線維は同じく弓状核のa-MSHニューロンへ投射していることが分かった。さらに、NPGLを脳室内投与した結果、摂食行動を亢進した。

研究成果の概要(英文)：We recently identified a novel cDNA encoding a small secretory protein of 80 amino acid residues, termed neurosecretory protein GL (NPGL), from the chicken hypothalamus. Homologs of NPGL have been reported to be present in mammals, such as rat and mouse. In this study, we optimized the synthesis of NPGL by microwave-assisted solid-phase peptide synthesis. We found that NPGL increased food intake and the mass of white adipose tissue (WAT) in rats. NPGL induced carbohydrate intake. NPGL mRNA expression was upregulated by fasting and low insulin levels. Subsequently, we identified the cDNA encoding NPGL from the mouse hypothalamus. We found that NPGL mRNA is robustly expressed in the lateroposterior part of the arcuate nucleus in the hypothalamus. NPGL-immunoreactive fibers were observed in close anatomical contact with a-MSH neurons in the arcuate nucleus. NPGL mRNA expression was elevated by fasting and reduced by feeding of a high-fat diet. Furthermore, NPGL increased food intake.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：視床下部 神経ペプチド ペプチド合成 摂食行動 脂肪蓄積

1. 研究開始当初の背景

自律神経や内分泌調節の中枢である視床下部に特異的に発現している神経ペプチドの前駆体遺伝子を探索した結果、80 アミノ酸残基からなる分泌性の長鎖ペプチド(小タンパク質)をコードする新規遺伝子を発見した。本長鎖ペプチドを C 末端部分の配列から、Neurosecretory protein GL (NPGL) と命名した。鳥類ニワトリを用いた解析から、本 NPGL 遺伝子の発現細胞の局在部位は視床下部漏斗部内の乳頭体核と漏斗核であることを見出した。さらに、ゲノムデータベース解析の結果、本遺伝子のホモログ遺伝子は脊椎動物に保存されていることも明らかにしている。ラットを用いた解析から、飢餓状態、肥満状態、糖尿病状態において、本 NPGL 遺伝子の発現が変化することも見出し、NPGL がエネルギー代謝調節に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規分泌性小タンパク質である NPGL の生理機能、生理的意義、作用機序を解明することである。動物種は、ラットとマウスを用いた。

まず、NPGL の生理機能解明のためには、人工的に合成した合成ペプチドの入手が必要不可欠であった。そこで、本研究の第一段階として、80 アミノ酸残基からなる NPGL をマイクロウェーブ固相合成機を用いて、合成方法の確立を行った。

次に、合成 NPGL を用い、慢性投与や抗体作製を行い、生じる生理作用の解析と形態解析を行った。さらに前駆体遺伝子の視床下部領域での過剰発現実験により、より長期的なスパンでの NPGL の表現型を解析した。

3. 研究の方法

合成 NPGL の作製方法の確立

成熟 NPGL はシグナルペプチド直後から続く 80 アミノ酸残基からなり、C 末端側がアミド化し、さらに内部にジスルフィド結合を有していると予測された。先行研究では大腸菌の組み換えタンパク質の合成系を用い、NPGL を産出することを試みていた。しかしながら、より効率の良い方法を確立するために、ペプチド固相合成機を利用した NPGL の合成方法を確立する研究を行った。

ラットを用いた解析

ゲノム配列情報に基づいて、ラットでも NPGL 遺伝子の存在は明らかになっているが、脳内や末梢組織での発現部位は不明であった。リアルタイム PCR 法を用い、NPGL 遺伝子発現量を解析した。加えて、NPGL 抗体を作製し、形態学的解析を行い、脳内の発現部位を解析した。

次に合成した NPGL を用い、ラットの脳室内へ単回及び慢性投与を行い、対照群の

動物との比較を行い、NPGL の生理的变化を解析した。さらに、NPGL 抗体を脳室内へ投与し、投与実験の結果と逆の効果がみられるかを検討した。

アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた実験では、視床下部領域で NPGL 遺伝子を過剰に発現した際の表現型を解析した。摂食量、体重変化、内臓組織重量、脂肪組織量、筋肉量等を測定した。さらに、呼吸代謝解析、活動量についても測定した。

一方、マクロ栄養素飼料を用い、NPGL を脳室内慢性投与し、摂食行動の変化を観察した。

最後に、生理的意義を解明するために、飢餓状態や血中インスリン量を変化させた際の NPGL 発現変化を調べた。

マウスを用いた解析

マウスにおいて NPGL 遺伝子の cDNA クローニング、脳内の発現部位の解析、既知の神経ペプチド産生細胞とのインターアクションの解析、飢餓状態・高脂肪食摂餌下での影響、NPGL による摂食行動への影響を解析した。

4. 研究成果

合成 NPGL の作製方法の確立

成熟 NPGL は 80 アミノ酸残基からなる長鎖ペプチド(小タンパク質)であることが予想されており、実際にラットの視床下部抽出物でも 80 アミノ酸残基に相当する位置に陽性バンドを検出することができたため、長鎖ペプチド(小タンパク質)であることが示されている。さらに、分子内部にはシステイン残基が 2 残基あることからジスルフィド結合での架橋と、C 末端側のアミド化が生じていると思われる。

先行研究での組み換えタンパク質発現系を利用した成熟 NPGL の産出では、収量が悪く、また翻訳後修飾といった複雑なステップを経ないとならず、固相合成法による有機化学的な産出方法の確立が望まれていた。マイクロウェーブ照射付の自動ペプチド合成機を導入できたため、本合成機を用いた簡便かつ高収率のペプチド産出方法の確立を試みた。マイクロウェーブ照射の出力、照射時間、アミノ酸縮合活性化試薬、触媒溶液、脱保護時間、レジン残基等の様々な組み合わせで合成を行い、短時間で最高の収量を得る条件を確立することができた。本手法により、ラットとマウスの配列を有する NPGL を効率よく化学合成することが初めて可能となった。

ラットを用いた解析

リアルタイム PCR 法を用いた解析により、NPGL 遺伝子は脳内では視床下部基底部の領域に特異的に発現していることを見出した。そこで、視床下部基底部内での NPGL 産生細胞を詳細に解析する目的で、in situ 八

イブリダイゼーション法と NPGL 抗体を用いた免疫組織化学的手法により NPGL 産生細胞の局在を解析したところ、視床下部の結節乳頭体核と弓状核尾側部においてのみ NPGL 産生細胞が局在していることを見出した。NPGL 陽性神経線維は、視床下部内のみ検出されたことから、NPGL は視床下部領域内で作用していることが示された。

次に、のマイウロウェーブ固相合成法にて産出した合成 NPGL を用い、ラットの脳室内へ単回投与したところ、顕著な摂食行動への影響は観察できなかった。そこで、脳室内へ浸透圧ポンプを用い 2 週間、慢性的に投与した結果、対照群の動物と比較して、摂食量や体重への影響は見られないものの、脂肪重量が増加していることを見出した。形態学的に脂肪滴の面積を計測した結果でも脂肪蓄積作用が確認できた。この効果は、NPGL 抗体を脳室内に慢性的に投与し、内因性の成熟 NPGL の作用をブロックした際には、逆に脂肪滴の大きさが対照群に比べ小さいという結果からも、NPGL の脂肪蓄積作用を示唆していると考えられる。

2 週間の脳室内慢性投与では体重増加を観察するには短いと考え、AAV を用いたより長期間の NPGL 遺伝子過剰発現実験による影響を観察することを試みた。その結果、摂食量は過剰発現開始の約 3 週間後から対照群と比較して増加することが明らかになった。体重の増加は 1.5 ヶ月の過剰発現では認められなかったが、脂肪重量は NPGL 慢性投与の結果と同様に、有意に増加させる働きがあることが示された。脂肪組織以外の内臓組織重量の変化は認められなかったが、筋肉重量の減少が認められ、このことが体重増加には影響がなかった原因と思われる。呼吸代謝量と活動量を測定したところ、活動量への影響はないものの呼吸商の増加が認められ、脂肪代謝への影響が示唆された。そこで、脂肪組織や肝臓において、脂肪合成及び脂肪酸化に関わる酵素群の遺伝子発現解析を行った結果、脂肪合成に関与する遺伝子の発現亢進が観察された。脂肪合成に関わる酵素に関してウエスタンブロット解析や脂肪酸量を測定したところ、脂肪合成が亢進していることを示唆する結果を得た。

一方、高脂肪高ショ糖食摂餌条件下で NPGL 遺伝子の過剰発現実験を行ったところ、摂食量、体重、脂肪蓄積共に顕著な促進効果が認められた。

次に、タンパク質食、炭水化物食、脂肪食を別々に粉末飼料としたマクロ栄養素飼料を用いた行動解析では、NPGL 投与により炭水化物摂食を亢進する作用が認められた。このことから、NPGL は炭水化物からの脂肪合成を活性化し、その基質となる炭水化物摂取を積極的に促す作用があることが示唆された。

飢餓状態や糖尿病モデル動物での解析から、血中インスリン量が低下した際に NPGL

遺伝子発現が亢進することが示唆された。この結果から、NPGL 産生細胞が血中インスリンレベルを感知することで発現制御が行われている可能性が示された。次に、インスリン応答の指標となるリン酸化 Akt の発現亢進をインスリン投与後に NPGL 産生細胞で解析した結果、NPGL 産生細胞はインスリンに応答することを明らかにした。

以上の解析から、NPGL 産生細胞は、飢餓状態で血中インスリンレベルが低下した際に発現が亢進し、摂食可能になった際に効率よく炭水化物を摂取し、脂肪蓄積を行う働きがあることが示唆された。逆に、食後に血中インスリン量が上昇した際には、NPGL 発現は低下するという結果も得ていることから、インスリンと NPGL は協調しながら脂肪蓄積量を一定に保つ働きがあると考えられる。

マウスを用いた解析

ラットと同じげっ歯類のマウスを用いた解析は、今後遺伝子改変動物を作製した際の基礎的なデータとなるため、ラットと同様の手法を用い、NPGL の生理機能解析を行った。

ラットと同様に視床下部基底部に特異的に NPGL 遺伝子が発現していることを見出した。さらに、形態学的な解析により、弓状核尾側部にのみ NPGL 産生細胞を検出した。飢餓状態では発現が亢進し、逆に高脂肪食摂取時の飽食により NPGL 発現が低下することが明らかになった。脳室内単回投与を行ったところ、時間依存的に摂食行動を亢進させる効果が認められた。最後に、既知の神経ペプチド産生細胞との神経連絡を解析したところ、摂食抑制因子の α -MSH 産生細胞への NPGL 神経線維の投射が観察された。このことから、摂食抑制ニューロンの活動を抑制することで摂食行動を亢進させている可能性が示唆された。

以上の通り、これまで知られていなかった新しい視床下部因である NPGL を同定し、生理機能、生理的意義、作用機序の解明に関する研究を精力的に進めた。その結果、NPGL は、脂肪蓄積や摂食行動への影響など、エネルギーホメオスタシスに関わる生理作用を有していることを初めて見出すことができた。これらの成果は eLife 誌や Endocrinology 誌などの一流誌に成果を掲載することができた。特に、アメリカ内分泌学会が選別する神経内分泌学分野のトピックスに我々の論文が選ばれたことから分かるように、神経内分泌学や代謝学などの分野で注目される発見をすることができたと考えている。また、2014 年以降で計 8 件の学会賞・学会発表賞を NPGL に関係した仕事に対して与えられており、我々の研究成果が高く認められた証であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

(雑誌論文)(計18件、全て査読有)

1. Shikano K, Bessho Y, Kato M, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Furumitsu M, Tachibana T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Localization and function of neurosecretory protein GM, a novel small secretory protein, in the chicken hypothalamus. *Sci. Rep.* 8:704 (2018)
2. Shikano K, Taniuchi S, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Chronic subcutaneous infusion of neurosecretory protein GM increases body mass gain in chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* (2018) in press.
3. Ukena K. Avian and murine neurosecretory protein GL participates in the regulation of feeding and energy metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 260:164-170 (2018)
4. Shikano K, Kato M, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Matsuura D, Masuda K, Tachibana T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Effects of intracerebroventricular infusion of neurosecretory protein GL on body mass and food and water intake in chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 256:37-42 (2018)
5. Iwakoshi-Ukena E, Shikano K, Kondo K, Taniuchi S, Furumitsu M, Ochi Y, Sasaki T, Okamoto S, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Minokoshi Y, Ukena K. Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity. *eLife* 6:e28527 (2017)
6. Matsuura D, Shikano K, Saito T, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Neurosecretory protein GL, a hypothalamic small secretory protein, participates in energy homeostasis in male mice. *Endocrinology* 158:1120-1129 (2017)
7. Leprince J, Bagnol D, Bureau R, Fukusumi S, Granata R, Hinuma S, Larhammar D, Primeaux S, Sopkova-de Oliveira Santos J, Tsutsui K, Ukena K, Vaudry H. The Arg-Phe-amide peptide 26RFa/QRFP and its Receptor. *IUPHAR Review* 24. *Br. J. Pharmacol.* 174:3573-3607 (2017)
8. Masuda K, Furumitsu M, Ooyama H, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Synthesis of neurosecretory protein GM composed of 88 amino acid residues by native chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* 57:804-807 (2016)
9. Tachibana T, Kubo S, Khan MS, Masuda K, Ukena K, Wang Y. Peripheral injection of chicken growth hormone-releasing hormone inhibits feeding behavior in chicks. *J. Poult. Sci.* 53:29-33 (2016)
10. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Osugi T, Tsutsui K. Identification and localization of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) orthologs in the hypothalamus of the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 227:69-76 (2016)
11. Masuda K, Furumitsu M, Taniuchi S, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Production and characterization of neurosecretory protein GM using *Escherichia coli* and Chinese Hamster Ovary cells. *FEBS Open Bio* 5:844-851 (2015)
12. Masuda K, Ooyama H, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of neurosecretory protein GL composed of 80 amino acid residues. *J. Pept. Sci.* 21:454-460 (2015)
13. Sasanami T, Izumi S, Sakurai N, Hirata T, Mizushima S, Matsuzaki M, Hiyama G, Yorinaga E, Yoshimura T, Ukena K, Tsutsui K. A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird. *Sci. Rep.* 5:7700 (2015)
14. Tachibana T, Sugimoto I, Oginio M, Khan MS, Masuda K, Ukena K, Wang Y. Central administration of chicken growth hormone-releasing hormone decreases food intake in chicks. *Physiol. Behav.* 139:195-201 (2015)
15. Bessho Y, Iwakoshi-Ukena E, Tachibana T, Maejima S, Taniuchi S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Ukena K. Characterization of an avian histidine decarboxylase and localization of histaminergic neurons in the chicken brain. *Neurosci. Lett.* 578:106-110 (2014)
16. Masuda K, Iwakoshi-Ukena E, Bessho Y, Taniuchi S, Maejima S, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Ukena K. Identification of neurotensin and LANT-6 and localization of mRNA

encoding their precursor in the chicken brain. Zool. Sci. 31:353-359 (2014)

17. Ukena K, Osugi T, Leprince J, Vaudry V, Tsutsui K. Molecular evolution of GPCRs: 26RFa/GPR103. J. Mol. Endocrinol. 52:T119-T131 (2014)
18. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 446:298-303 (2014)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 浮穴和義 視床下部における新しいエネルギー代謝調節因子 第 42 回度日本比較内分泌学会大会シンポジウム 2017 年 11 月奈良
2. 鹿野健史朗、松浦大智、齋藤鷹也、越智祐太、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義 第 22 回アディポサイエンスシンポジウム「視床下部分泌性小タンパク質 NPGI はマウスにおいてエネルギーホメオスタシスを制御する」若手優秀研究奨励賞受賞 2017 年 8 月大阪
3. 浮穴和義 平成 28 年度日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム「鳥類の視床下部に存在する神経ペプチドの探索と生理機能に関する研究」奨励賞受賞者講演 2016 年 12 月神奈川
4. 浮穴和義、岩越栄子、鹿野健史朗、近藤邦裕、谷内秀輔、益田恵子、別所裕紀、古満芽久美 第 34 回内分泌代謝学サマ―セミナー「視床下部で新たに発見した分泌性小タンパク質の生理機能解析」優秀ポスター受賞 2016 年 7 月福岡
5. 鹿野健史朗、近藤邦裕、益田恵子、岩越栄子、古満芽久美、浮穴和義 第 40 回日本比較内分泌学会大会「Effect of a hypothalamic neurosecretory protein on food preference」若手研究者最優秀発表賞受賞 2015 年 12 月広島
6. 加藤正暉、鹿野健史朗、益田恵子、岩越栄子、浮穴和義 第 39 回鳥類内分泌研究会「ニワトリの脳内における 2 種類の新規視床下部分泌性小タンパク質の生理機能」若手研究奨励賞受賞 2015 年 11 月兵庫
7. 浮穴和義、鹿野健史朗、近藤邦裕、益田恵子、岩越栄子 視床下部新規小タンパク質によるエネルギー代謝及び摂食行動への影響 第 86 回日本動物学会大会シンポジウム「本能行動を制御するペプチドホルモンのはたらき～生殖・摂食・情動行動を司る分子機構～」2015 年 9 月新潟

8. 浮穴和義 ニワトリにおける新規脳因子の発見―哺乳類での新展開― 第 9 回広島大学日本鶏資源開発プロジェクト研究センター(JAB)特別セミナー 2014 年 12 月広島
9. 浮穴和義 視床下部で発見した小タンパク質によるエネルギー代謝制御機構 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会 シンポジウム「神経ペプチドと摂食・エネルギー代謝」2014 年 9 月奈良
10. 益田恵子、大山晴香、鹿野健史朗、近藤邦裕、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義 第 46 回若手ペプチド夏の勉強会「マイクロウェーブを用いた Fmoc 固相法による 2 つの新規視床下部小タンパク質の合成」優秀講演賞受賞 2014 年 8 月京都
11. 別所裕紀、鹿野健史朗、近藤邦裕、岩越栄子、古満芽久美、谷内秀輔、益田恵子、前嶋 翔、浮穴和義 第 32 回内分泌代謝学サマ―セミナー「新規視床下部分泌性小タンパク質の褐色脂肪組織への影響」ベストポスター受賞 2014 年 7 月山梨
12. 鹿野健史朗、谷内秀輔、岩越栄子、別所裕紀、前嶋 翔、益田恵子、近藤邦裕、古満芽久美、橋 哲也、浮穴和義 日本動物学会中国四国支部第 66 回大会「新規視床下部分泌性小タンパク質(NPGM)はニワトリの体重増加を亢進させる」若手研究者優秀発表賞受賞 2014 年 5 月岡山

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：成長ホルモン発現抑制剤、成人成長ホルモン分泌不全症モデル非ヒト動物、成人成長ホルモン分泌不全症モデル非ヒト動物の作製方法、褐色脂肪細胞の機能調整剤、脂肪蓄積症モデル非ヒト動物及び脂肪蓄積症モデル非ヒト動物の作製方法
発明者：浮穴和義、岩越栄子、谷内秀輔、鹿野健史朗、近藤邦裕
権利者：広島大学
種類：特許
番号：特願 2014-206791
出願年月日：2014 年 10 月 7 日
国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：ポリペプチド、ポリペプチドの製造方法、摂食調節組成物および摂食量の調節方法
発明者：浮穴和義、岩越栄子、益田恵子、古満芽久美
権利者：広島大学

種類：特許
番号：国内特許番号 P5875105
取得年月日：2016 年 1 月 29 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ukena/>

6．研究組織

(1)研究代表者

浮穴 和義 (UKENA, Kazuyoshi)
広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：10304370

(2)研究分担者

岩越 栄子 (IWAKOSHI, Eiko)
広島大学・大学院総合科学研究科・研究員
研究者番号：50311296